



BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Genetisch veränderte T-Zellen

Die Erfindung betrifft genetisch veränderte reife T-Zellen mit autoreaktiven Rezeptoren, die in ihrem Genom mindestens ein extern eingeführtes Gen tragen, das zur Expression eines (Poly)peptids fähig ist. Die Erfindung betrifft ferner Arzneimittel, die derartige T-Zellen enthalten.

Die moderne Medizin entwickelt sich immer weiter dahingehend, schwere operative Eingriffe zu vermeiden und klinisch gleichwertige oder günstigere Ergebnisse durch andere, neue Verfahren zu erzielen, die den Patienten vor allen vom physischen Trauma einer Operation befreien.

Derartige neue Verfahren wurden in der Vergangenheit beispielsweise auf der Grundlage von Erkenntnissen der Molekularbiologie, insbesondere in Verbindung mit den Disziplinen Immunologie und Neurologie entwickelt. So ist z.B. versucht worden, Tumorthérapien durch Applikation von gegen Tumoran-

tigene gerichteten Antikörpern, gekoppelt an Toxine zu etablieren; vgl. Vallera, Blood 83 (1994), 309-317. Andererseits ist bei der Isolierung und Clonierung neurotropher Faktoren, wie BDNF, NGF oder NT-3 daran gedacht worden, sie zur Behandlung degenerativer Krankheiten des Nervensystems einzusetzen (vgl. z.B. WO 91/03568).

Vielen dieser Verfahren liegt die Idee zugrunde, einen Wirkstoff so an den gewünschten Zielort zu transportieren, daß er nur dort seine Aktivität entfaltet. Die praktische Umsetzung dieser Idee scheitert bisher in der Regel daran, daß die Wirkstoffe nicht oder nur zu einem bestimmten Prozentsatz tatsächlich ihren Zielort erreichen. Einige Gewebe, besonders das Gehirn und die peripheren Nerven, sind nämlich durch eine dichte endotheliale Blut-Hirnschranke vom Blutkreislauf abgetrennt. Ins Blut verabreichte makromolekulare Wirkstoffe erreichen somit nur sehr schwer die "sequestrierten" Gewebe. Dadurch wird einerseits der gewünschte therapeutische Effekt der genannten Verfahren möglicherweise nicht erreicht, andererseits kann es, wie im Falle der Immuntoxine, zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen, wenn der Wirkstoff an einem anderen, als dem gewünschten Zielort abgeladen wird. Wie im Stand der Technik bekannt ist, wird der Zugang für im Stand der Technik bekannte Wirkstoffe, wie z.B. Immuntoxine, durch die Bluthirnschranke verhindert. Ausnahmen für medizinisch wirksame Substanzen, die diese Schranke überwinden konnten, bildeten bisher nur lipophile Substanzen bzw. über spezifische Rezeptoren transportierte Substanzen (z.B. Transferrin).

Der Erfindung lag somit die Aufgabe zugrunde, ein Vehikel bereitzustellen, mit dem ein biologisch aktives Molekül an ein gewünschtes Zielmolekül bzw. Zielgewebe transportiert werden kann und nur mit diesem interagiert. Die Lösung dieser Aufgabe erfolgt durch die Bereitstellung einer T-Zelle mit den Merkmalen des Anspruchs 1.

Somit betrifft die Erfindung eine genetisch veränderte, reife T-Zelle mit den folgenden Eigenschaften:

- (a) ihr Rezeptor ist autoreaktiv; und
- (b) sie trägt in ihrem Genom mindestens ein extern eingeführtes, in reifen T-Zellen normalerweise nicht exprimiertes Gen, das zur Expression eines (Poly)peptids fähig ist.

Der Begriff "genetisch verändert" im Sinne dieser Anmeldung bedeutet, daß die T-Zelle oder ihr Vorläufer mit molekularbiologischen Techniken verändert worden ist. Geeignete molekularbiologische Techniken, wie Vektorkonstruktionen, Transformationen bzw. Transfektionen oder (induzierbare) Expressions sind beispielsweise in Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1989) beschrieben.

Der Begriff "autoreaktiv" bedeutet, daß der T-Zell-Rezeptor ein Autoantigen, das durch ein MHC-Molekül einer geeigneten Zelle präsentiert wird, zu binden.

Der Begriff "extern eingeführtes, in reifen T-Zellen normalerweise nicht exprimiertes Gen" bedeutet im Sinne dieser Erfindung, daß das (Poly)peptid codierende Gen, welches homologen oder heterologen Ursprungs sein kann, in reifen T-Zellen in vivo nicht exprimiert wird und die Expression erst durch die molekularbiologischen Manipulationen erreicht wird. Das extern eingeführte Gen kann beispielsweise unter der Kontrolle eigener Regulationselemente stehen.

Erfindungsgemäß können in die T-Zellen ein oder mehrere dieser Gene auf einem oder mehreren Vektoren gleichzeitig oder aufeinanderfolgend eingeführt worden sein.

Mit der erfindungsgemäßen T-Zelle wird zum ersten Mal ein Vehikel bereitgestellt, das ein heterologes Protein direkt und spezifisch an eine Zielsequenz bzw. Zielort beispielsweise im Nervensystem transportieren und dort abliefern kann. Diese Spezifität wird erreicht durch die Spezifität des T-Zell-Rezeptors, der ein durch ein MHC-Molekül präsentiertes bestimmtes Autoantigen erkennt. Da bekannt ist, daß

das Reaktivitätsmusters eines T-Zell-Rezeptors hochspezifisch ist, kommt es nicht zu Interaktionen des T-Zell-Rezeptors und damit des zu transportierenden Moleküls mit anderen unerwünschten Molekülen im Körper eines Patienten.

Im Bereich des Nervensystems kommt eine weitere, für den vorgeschlagenen Therapieweg nutzbare Eigenheit hinzu. Während die Zellen des gesunden Hirngewebes kaum MHC-Moleküle produzieren und somit auch nicht in der Lage sind, den T-Lymphozyten (Selbst-)Antigen erkennbar zu präsentieren, werden MHC-Antigene in einer Vielzahl pathologischer Veränderungen induziert. Die betrifft in besonderem Maße degenerative und entzündliche Prozesse, in deren Gefolge Gliazellen des Nervengewebes die Fähigkeit erwerben, Antigene zu präsentieren. Als Beispiele sind, außer den (Auto-)Immunentzündungen Krankheiten, wie M. Parkinson oder Alzheimer, zu nennen. Wie gezeigt wurde, spüren die erfindungsgemäßen hirnreaktiven T-Lymphozyten vorzugsweise solche veränderte Hirnpartien auf, Gewebssareale, wo die therapeutischen Agentien besonders gebraucht werden.

Damit wurde in der vorliegenden Erfindung die Fähigkeit aktivierter T-Zellen ausgenutzt, die Bluthirnschranke zu durchdringen.

In der medizinischen Praxis wird einem Patienten zur Herstellung der erfindungsgemäßen T-Zelle ein Pool reifer T-Zellen nach üblichen Verfahren entnommen und sofort auf uniforme Eigenschaften, insbesondere hinsichtlich der Rezeptorspezifität, hin selektioniert. Nach Vornahme der molekularbiologischen Manipulationen wird die erfindungsgemäße T-Zelle üblicherweise dem Patienten wieder appliziert, dem die T-Zellen ursprünglich entnommen worden waren, um Histokompatibilitätsprobleme zu vermeiden.

Mit dem erfindungsgemäßen System können neurotrophe Moleküle oder antiinflammatorische Faktoren beispielsweise an bestimmte Zielorte gebracht werden und dort zur Verhinderung schädlicher Nebenwirkungen eingesetzt werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß die neurotrophen Faktoren auf eine Zielzelle einwirken und dort eine Kaskade gewünsch-

ter biochemischer oder metabolischer Ereignisse in Gang setzt. Ein Beispiel hierfür ist, daß bei Parkinson-Patienten die noch verbliebene Substantia nigra am Überleben gehalten und so ein weiterer Zellverlust vermieden wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen T-Zelle wird das exprimierte (Poly)peptid auf der Oberfläche exponiert oder sezerniert.

Die Expression des (Poly)peptids auf der Oberfläche erfolgt dann, wenn das (Poly)peptid eine Membranverankerungssequenz aufweist. Sofern das (Poly)peptid eine derartige Sequenz natürlicherweise nicht enthält, kann diese ohne Probleme nach üblichen Verfahren gentechnisch angefügt werden.

Die Oberflächenexpression des (Poly)peptids ist vor allem dann wünschenswert, wenn eine Interaktion lediglich mit der Zelle erfolgen soll, an die die T-Zelle über ihren Rezeptor andockt hat.

Dagegen ist die Sezernierung des (Poly)peptids wünschenswert, wenn dessen Wirkung nicht auf die andockte Zelle selbst beschränkt bleiben soll. Beispiele für sezernierte (Poly)peptide sind Antikörper oder neurotrophe, immunmodulierende oder wachstumsregulierende Substanzen.

Sofern diese (Poly)peptide natürlicherweise keine für den Export notwendigen Signalsequenzen aufweisen, kann der Fachmann diese leicht auf gentechnologischem Wege anheften.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen T-Zelle hemmt oder aktiviert das exprimierte (Poly)peptid die Expression endogener Proteine, wobei die Hemmung oder Aktivierung zu einer Veränderung des Musters an der Oberfläche exprimierter endogener (Poly)peptide oder sezernierter Proteine/Peptide bewirkt.

In dieser Ausführungsform der Erfindung übt das (Poly)peptid eine Triggerfunktion aus, um das Expressionsmuster der Zelle zu verändern. Durch diese Veränderung des Expressionsmusters wird wiederum ein gewünschter Effekt auf ein Zielmolekül oder eine Zielzelle ausgeübt, die beispielsweise über die

Expression oder die Hemmung der Expression eines neurotrophen, immunmodulierenden oder wachstumsregulierenden Moleküls oder eines Oberflächenmoleküls erzielt wird. Ein Beispiel für diese Ausführungsform sind Immunmodulatoren, die im Gehirn die Expression der MHC-Moleküle herunter regulieren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen T-Zelle ist deren Rezeptor gegen ein Epitop des Nervensystems gerichtet.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Epitop ein Epitop des zentralen Nervensystems. Als Beispiele sind Proteine zu nennen, welche speziell in bestimmten Hirnarealen bzw. definierten Zelltypen vorkommen. Dies ist der Fall für Transmitter-spezifische Enzyme (Tyrosin-Hydroxylase), aber auch möglicherweise für das Pigment der Substantia nigra (Parkinson) oder bestimmte Transmitterrezeptoren. Ferner sind hier regional spezifische Rezeptoren und Neuropeptide, z.B. Galanin, CGRP zu nennen.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Epitop ein Epitop des peripheren Nervensystems.

Eine weitere besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft eine T-Zelle, deren Rezeptor gegen ein Epitop des Myelinproteins P2 oder gegen S100 gerichtet ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen T-Zelle ist das Epitop ein Epitop eines zustandsspezifischen Proteins, beispielsweise von Amyloid Precursor Protein (APP), eines gewebespezifischen Proteins, eines Rezeptorproteins, z.B. regionalspezifische GABA-, Glutamat- oder Glycin-Rezeptoren, eines Cytoskelettproteins oder eines Transmittersyntheseenzym, z.B. der Tyrosin-Hydroxylase.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft eine T-Zelle, wobei das exprimierte (Poly)peptid ein neurotropher Faktor ist.

Unter dem Begriff "neurotropher Faktor" versteht man Mediatoren, welche Überleben, Wachstum und Differenzierung neuraler Zellen kontrollieren. Neurotrophine haben auch die Fähigkeit, Neuronen gegen vielfältige Schädigungen zu schützen und beeinträchtigte Funktionen zu restituieren.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen T-Zelle gehört der neurotrophe Faktor zur NGF-Genfamilie (Neurotrophine) und ist beispielsweise NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6 oder andere neurotrophe Faktoren, wie FGF, GDNF oder CNTF. Der Transport dieser neurotrophen Faktoren, allein oder in Kombination, mittels erfindungsgemäßer, gegen ein Epitop des Nervensystems gerichteter autoreaktiver T-Zellen ermöglicht z.B. das Studium und die Anwendung von Therapiemöglichkeiten bei degenerativen, traumatischen, metabolischen oder myelodegenerativen Erkrankungen des Nervensystems, wie z.B. der Alzheimer-Krankheit, der Parkinson'schen Krankheit, Tumoren, Degenerationskrankheiten, Autoimmunkrankheiten, Infekten, metabolischen oder traumatischen Erkrankungen.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft eine T-Zelle, die den $CD4^+ CD8^-$ -Phänotyp aufweist. T-Helfer-Zellen werden vor allem dann als Vehikel zum Einsatz kommen, wenn $CD4^+$ T-Lymphozyten in zwei Subklassen vorkommen (Th1 und Th2), welche sich durch das Spektrum der produzierten Cytokine unterscheiden und somit auch unterschiedliche Funktionen aufweisen. Th1 Zellen produzieren neben IL-2 besonders Interferon-gamma und Tumornekrosefaktor ($-\alpha$ und $-\beta$). Th2-Zellen hingegen sind auf IL-4, IL-5 und IL-10 spezialisiert. Th1-Zellen wären hauptsächlich bei degenerativen Prozessen, aber auch bei Tumoren einzusetzen (sie induzieren MHC-Antigene), während Th2-Zellen entzündungs-

dämpfend wirken und bei Autoimmunerkrankungen (etwa MS etc.) hilfreich wären.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft eine T-Zelle, die den $CD4^- CD8^+$ -Phänotyp aufweist. $CD8^+$ -Lymphozyten sind zumeist hoch effektive Killerlymphozyten, die Ihr Einsatzgebiet im Bereich der Tumor-, aber auch der Virusabwehr finden können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen T-Zelle steht das extern eingeführte Gen unter der Kontrolle retroviraler Regulationselemente.

Unter "retroviralen Regulationselementen" wird hier jedes Regulationselement zur Expression von Genen verstanden, das aus Retroviren isoliert worden ist oder von derartigen Elementen abgeleitet wurde. Beispiele für derartige Regulationselemente sind retrovirale Promotore oder Enhancer.

Die Verwendung retroviraler Regulationselemente hat vor allem den Vorteil, daß die unter ihrer Kontrolle stehenden Gene erst mit der Aktivierung der T-Zellen exprimiert werden. Mit anderen Worten, das (Poly)peptid wird erst dann exprimiert, wenn die T-Zellen durch Interaktion des Rezeptors mit dem Antigen aktiviert werden. Dadurch wird eine gewebespezifische Expression und eine Steuerbarkeit der Expression des (Poly)peptids durch die Aktivierung der T-Zelle am Zielort erreicht. Wie dem Fachmann bekannt ist, können die regulatorischen Elemente den jeweiligen Erfordernissen angepaßt werden.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft eine T-Zelle, in der das extern eingeführte Gen unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht.

Auch die Verwendung eines induzierbaren Promotors hat den Vorteil, daß die Expression des (Poly)peptids in der T-Zelle steuerbar ist und damit gewebespezifisch erfolgen kann. Induzierbare Promotoren sind im Stand der Technik weithin bekannt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen T-Zelle steht das extern eingeführte Gen unter der Kontrolle T-Zell-spezifischer Regulationselemente.

Hierbei könnte eine feiner abgestimmte Aktivierung des extern eingeführten Gens (Transgens) erreicht werden, eventuell auch eine längere (permanente) Expression des Transgens.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen T-Zelle ist das extern eingeführte Gen rekombinanter Bestandteile des Genoms eines lytischen/lysogenen T-Zell-spezifischen Virus, welches die T-Zelle nach Anheftung des Rezeptors an das Zielepitop lysieren kann.

Auch diese Ausführungsform dient der definierten Freisetzung des (Poly)peptids an seinem Zielort. Die Funktion der Sezernierung aus der Zelle bei vorstehend diskutierten erfindungsgemäßen Ausführungsformen wird durch die Apoptose der erfindungsgemäßen T-Lymphocyten verstärkt, welche durch das besondere Mikromilieu des Zielgewebes gefördert werden.

Die Erfindung betrifft ferner ein Arzneimittel, das eine erfindungsgemäße T-Zelle in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger enthält.

Die Formulierung derartiger Arzneimittel ist dem entsprechenden Fachmann bekannt.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel können prinzipiell bei allen Krankheiten, deren Behandlung eine lokale Interaktion des (Poly)peptids oder einer Kombination von (Poly)peptiden mit einem oder mehreren Zielmolekülen aufweist, eingesetzt werden. Dabei ist denkbar, daß ein derartiges Arzneimittel eine oder mehrere unterschiedliche erfindungsgemäße T-Zellen enthält, die wiederum eines oder mehrere der extern eingeführten (Poly)peptide exprimieren. Die erfindungsgemäßen Arzneimittel sind geeignet beispielsweise zur Behandlung degenerativer oder inflammatorischer Erkrankungen.

Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen T-Zelle zur Behandlung degenerativer Erkrankungen wie ALS (amyotrophe Lateralsklerose), Alzheimer-Krankheit, Parkinson'scher-Krankheit, Multipler Sklerose, von Traumata, Infektionen, Autoimmunkrankheiten, Immunsuppressionen, vaskuläre Insulte, Tumoren, oder akuter Ödeme.

Die Figuren zeigen:

- Fig. 1 A: retrovirales NGF-Konstrukt, das zur Transduktion von R4-Lymphocyten verwendet worden ist;
 B: NGF-Produktion durch R4-T-Zellen nach retroviraler Transduktion;
 C: NGF-Expression in EAN (Experimentelle Autoimmun-Neuritis) in Filtraten durch transduzierte T-Lymphocyten (in situ-Hybridisierung). Die Tiere wurden 14 Tage nach der Injektion von $2,5 \times 10^6$ NGF-transduzierten (oberes und unteres Schaubild) oder Wildtyp-R4-Lymphocyten (mittleres Schaubild) in die Schwanzvene von Ether-anästhesierten ausgewachsenen Lewis-Ratten geopfert;
- Fig. 2 Klinische Ergebnisse und Gewichtsänderungen in Ratten, in denen EAN induziert worden ist. Die Tiere wurden täglich auf klinische Krankheits-symptome (Fig. 2 A) und Gewichtsänderung (Fig. 2 B) untersucht;
- Fig. 3 Histopathologische Veränderungen des Ischianervs nach Injektion von Wildtyp (a), scheintransduzierten (b) oder NGF-transduzierten R4-Lymphocyten (c).
 Linke Reihe: Toluidin-Blaufärbung von Semidünnschnitten.
 Rechte Reihe: elektronenmikroskopische Aufnahme.
- Fig. 4 Zelluläre Zusammensetzung von EAN-Infiltraten, die durch NGF-transduzierte oder Kontroll-T-Zelllinien in Gegenwart oder Abwesenheit von exogenem NGF verursacht wurden:

Immunhistochemische Färbung von W3/13-positiven T-Lymphocyten (linke Reihe) oder ED1-positiven Makrophagen (rechte Reihe) im Ischiasnerv, positive Zellen. Positive Zellen sind Zellen, die den Antikörper binden, also das Marker-Antigen auf der Oberfläche exprimieren.

Behandlungsgruppen: a, nur Wildtyp-R4-Zellen, b, NGF-transduzierte R4-Zellen, c) und d) Wildtyp-R4-Zellen in Kombination mit der Verabreichung von entweder BSA (c) oder NGF-Protein (d), e, Verteilung von ET1- und W3-13 positiven Zellen aus a) bis d) als Balkengraphik gezeigt, einschließlich der Werte für Empfänger von scheintransduzierten R4-Zellen (Immunocytochemie nicht dargestellt).

*Statistische Signifikanz wurde durch den Student t-Test untersucht $p < 0,00001$.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Transduktion von P2-spezifischen, MHC-Klasse II-restringierten $CD4^+$ -T-Lymphocyten

Die neuritogene, P2-Protein-spezifische T-Zelllinie R4 wurde als zelluläres Vehikel von NGF in das periphere Nervensystem verwendet. R4-Lymphocyten induzieren eine demyelierende Autoimmunentzündung (EAN), die lediglich auf das periphere Nervensystem (PNS) beschränkt ist (Linington et al., J. Immunol. 133 (1984), 1946-1950). Die Läsion ist durch eine starke Infiltration mononuclearer Zellen, gefolgt von einer weitgehenden Zerstörung der Myelinscheide gekennzeichnet (Izumo, S. et al., Lab. Invest. 53 (1985), 209-218). Der zeitliche Verlauf und das Ausmaß der pathogenen Reaktionen sind in hohem Maße vorhersehbar. Die klinischen Manifestationen dieser Krankheit entwickeln sich sehr schnell vier Tage nach der Induktion der T-Zellen und sind durch eine

drastische Herabsetzung der Nervenleitung innerhalb weniger Stunden gekennzeichnet (Heiniger, K. et al., Ann. Neurol. 19 (1986), 44-49).

Für den Transport von NGF an das Zielmolekül wurden R4-Lymphocyten mit einem replikationsdefizienten, ecotrophischen rekombinanten Retrovirus transduziert, das die cDNA von Maus-NGF codiert (Fig. 1a). Zur Konstruktion dieses Vektors wurde zunächst ein 882 bp SphI/PstI-Fragment der Maus-NGF-cDNA (J. Scott et al., Nature 302 (1983), 538-540) unter die Kontrolle des viralen Promotors im 5'-LTR des 5,8 kb-Vektors pLXSN (D. Miller et al., Bio Technique 7, (1989) 980-990) gestellt. Funktioneller Spleißdonor (SD-) und Spleißakzeptor (SA-Stellen) befinden sich stromaufwärts der NGF-cDNA. Ein interner SV40-Promotor kontrolliert die Expression des G418-Resistenzgens (neo), während die Polyadenylierung (pA) innerhalb des 3'-LTR vonstatten geht. Die Initiation der Transkription ist durch Pfeile dargestellt. Mit dem so erhaltenen Konstrukt wurde die GP+E-86-Verpackungszelllinie (D. Markowitz et al., J. Virol. 62 (1988) S. 1120-1124) durch Calciumphosphat-Copräzipitation transfiziert. Der Retrovirus enthaltende Überstand wurde nach 48 Stunden gesammelt und zur Infektion einer mit Tunicamycin (100 ng/ml 16 Stunden) behandelten GP+E-86-Kultur verwendet. Einzelne G418 (1 mg/ml) resistente Clone wurden nach 12 Tagen subcloniert und auf die Produktion von infektiösen retroviralen Partikeln getestet, wobei die Anzahl der G418-resistenten NIH 3T3-Fibroblasten bestimmt wurde. Die Titer der einzelnen Verpackungsclone befanden sich im Bereich von 2 bis 6×10^6 Plaque-bildenden Einheiten (pfu) pro ml.

R4-Lymphocyten wurden in Gegenwart von nativem Rindermyelin-P2-Protein (20 µg/ml) und von Thymuszellen (1×10^6 -Zellen/ml bei 2000 R bestrahlt) als Quelle Antigen-präsentierender Zellen 48 Stunden lang aktiviert. Diese stimulierten Lymphoblasten wurden durch Übernacht-Behandlung mit RPMI 1640 enthaltend 5 % fötales Kälberserum, 15 % T-Zell-Wachsfaktor

(Überstand von ConA-aktivierten Mausmilzzellen) supplementiert mit 80 % Retrovirus (6×10^6 pfu/ml) und 8 μ g/ml Poly-pren transduziert. Virus enthaltender Überstand wurde durch wiederholtes Waschen entfernt und transduzierte R4-Lymphocyten wurden RPMI 1640-Medium resuspendiert und in einer 5 % CO₂ enthaltenden Atmosphäre bei 37°C gezüchtet. Konditionierte Medien von jeweils 10^6 Wildtyp (R4)-, NGF-Retrovirus transduzierten (R4NGF)- oder scheintransfizierten (Retrovirus, das nicht NGF codiert; R4mock) R4-Lymphocyten wurde auf NGF-Konzentration (pg/ml) 12 Stunden nach der Transfektion durch einen zwei Bindungsstellen testenden Immuntest (S. Korsching et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 3513-3516) getestet. Das Ergebnis dieses Versuches zeigt, daß Wildtyp R4-Zellen und R4-Zellen, die scheintransfiziert wurden, keine nachweisbaren Mengen an NGF produzierten. Dagegen schieden mit dem NGF-Retrovirus transduzierte R4-Lymphocyten mehr als 2000 pg/ml NGF in das Kulturmedium ab (Fig. 1b). Die NGF-Produktion durch R4-Zellen ist derjenigen von genetisch veränderten Ratten-Fibroblasten vergleichbar, die durch Übertragung in das zentrale Nervensystem verwendet wurden, um NGF zur Behandlung von experimentell erzeugten neurodegenerativen Krankheiten bereitzustellen (M.D. Kawaja et al., J. Neurosci. 12 (1992), 2849-2864). Die Transduktion an sich änderte weder die Antigenspezifität noch die proliferative Aktivität der R4-Zellen; das Th1-ähnliche Sekretionsmuster an Cytokinen mit einer starken Produktion von Il-2 und Interferon- γ blieb ebenso unverändert (Ergebnisse nicht dargestellt).

Beispiel 2

In vivo-Migration von mit dem NGF-Gen transduzierten neuritogenen T-Zellen

Die transduzierten R4-Lymphocyten infiltrierten das periphere Nervensystem in gleichem Umfang wie Wildtyp- oder scheintransfizierte R4-Zellen (Fig. 4). 14 Tage nach der in-

travenösen Injektion von NGF-transduzierten R4-Zellen konnte durch in situ-Hybridisierung (Fig. 1c) gezeigt werden, daß diese genetisch veränderten Lymphocyten NGF-mRNA im peripherem Nervensystem in vivo noch stark exprimieren. Für die Injektion wurden $2,5 \times 10^6$ -stimulierte Wildtyp (R4), NGF-transduzierte (R4NGF) oder scheintransfizierte (R4mock)-R4-Lymphocyten in die Schwanzvene Ether-anästhesierter Lewis-Ratten in einem Gesamtvolumen von 1 ml am Tag 0 injiziert. Klinische Symptome wurden nach der folgenden Einstufung aufgezeichnet: 1: Teilverlust des Schwanztonus; 2: vollständiger Verlust des Schwanztonus; 3: Paraparese der Hinterbeine; 4: Paralyse der Hinterbeine; 5: Paraparese der Vorderbeine. Alle Werte sind hier als Mittelwerte jeder Gruppe ($n = 3$) gegeben, wobei Standardabweichungen zwischen Tag 0 und Tag 9 eingeschlossen ist.

Die Tiere wurden 14 Tage nach der Injektion von $2,5 \times 10^6$ R3-T-Lymphocyten geopfert und mit 4 % Paraformaldehyd enthaltend 0,5 % Glutardialdehyd in 0,1 M phosphat-gepufferter Kochsalzlösung perfundiert, mit demselben Fixierungsmittel über Nacht bei 4°C immersionsfixiert und anschließend in Epon nach üblichen Verfahren eingebettet. Es wurden 1 µm Semithinschnitte hergestellt und mit 0,1 % Toluidinblau gefärbt, um das Ausmaß der Demyelinierung abzuschätzen; die Maßeinheit beträgt hier 2,5 µm. Ultradünne Schnitte wurden hergestellt und für die Elektronenmikroskopie aufbereitet, wie von J.Gehrmann et al. Lab. Invest. 67 (1992) 100-113 beschrieben; eine Einheit auf der Skala beträgt 1 µm.

Rinderserumalbumin oder NGF wurden Ether-anästhesierten Lewis-Ratten durch Implantation eines Schwammgelkissens (Spongostan) verabreicht, das entweder 125 µg NGF (2,5 S) oder 250 µg BSA (Sigma, Cohn-Fraktion V) in 50 µl 0,9 % Natriumchlorid enthielt. Die Verabreichung erfolgte in der Nähe des linken oder des rechten Ischiasnerves in der subglutealen Region derselben Ratte 24 Stunden vor der Injektion von $2,5 \times 10^6$ Wildtyp-R4-Zellen. ED1- und W13-positive

Zellen wurden aus fünf Bereichen jedes Präparats (n=3) gezählt und die Werte als Mittelwerte einschließlich der Standardabweichung in Zellen pro mm² gegeben.

Für die in situ-Hybridisierungen wurden Cryostatschnitte (10 µm) der Ischiasnerv-Präparationen (der Länge nach geschnitten) unter stringenten Bedingungen entweder mit einzelsträngigen ³⁵S-markierten Antisense (oberes und mittleres Schaubild) oder sinnorientierter (unteres Schaubild) NGF-spezifischer cDNA-Sonden hybridisiert, die durch reverse Transkription aus sinn- oder antisense-NGF-cRNA nach üblichen Verfahren (E. Castrén et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 9444-9448) hergestellt worden waren.

Beispiel 3

Antiinflammatorische Wirkung von lokal freigesetztem NGF

Die durch NGF-transfizierte R4-Zellen verursachten morphologischen Änderungen unterschieden sich deutlich von typischer EAN, die durch nicht- oder scheintransfizierte R4-Zellen herbeigeführt wurde (Fig. 3). Die Demyelinierung der Ischiasnerv-Axone war 14 Tage nach dem Transfer von NGF-synthetisierenden R4-Lymphocyten drastisch reduziert (Fig. 3c) wohingegen die mit dem Wildtyp (Fig. 3a) oder mit den scheintransfizierten R4-Zellen (Fig. 3b) behandelten Tiere die typischen Veränderungen der peripheren Myelinscheiden aufwiesen. Die immunocytochemischen Färbungen mit dem T-Lymphocyten-Marker W3/13 zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Anzahl von Wildtyp- oder von genetisch veränderten R4-Lymphocyten, die den Ischiasnerv infiltrierten (Fig. 4e). Im auffallenden Gegensatz zu den klassischen EAN-Läsionen wurden jedoch nach Transfer mit NGF-sezernierenden R4-Zellen ausgesprochen wenige Makrophagen nachgewiesen, wobei als Nachweissystem der lysosomale Marker ED1 diente (Fig. 4e).

Die veränderte Pathogenität genetisch modifizierter NGF-produzierender T-Zellen kann theoretisch zwei Gründe haben:

- (a) Die genetische Modifikation an sich könnte das pathogene Eigenpotential der neuritogenen T-Zellen vermindert haben, oder
- (b) das durch die genetisch veränderten T-Zellen synthetisierte NGF könnte die starke Verminderung der Demyelinierung bewirkt haben.

Sofern lokal freigesetzte NGF für die verminderte Pathogenität verantwortlich ist, sollte exogen verabreichtes NGF einen ähnlichen Effekt auf die Makrophagenaktivierung haben. Tatsächlich zeigte die örtliche Verabreichung von NGF-Protein durch Implantation eines Schwammgelkissens in vivo dieselbe Verminderung an Makrophageninvasion wie die NGF-produzierenden R4-Zellen (Fig. 4d). Die Implantation eines BSA enthaltenden Schwammgelkissens auf der contralateralen Seite (Fig. 4c) hatte hingegen keinen Einfluß auf die typische Makrophagenrekrutierung bei durch den Transfer von Wildtyp R4-Zellen induzierter EAN. Die Anzahl von W3/13 positiven Zellen auf den unterschiedlich behandelten Seiten der Ratten waren die gleichen (Fig. 4c, d).

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Genetisch veränderte, reife T-Zelle mit den folgenden Eigenschaften:
 - (a) ihr Rezeptor ist autoreaktiv; und
 - (b) sie trägt in ihrem Genom mindestens ein extern eingeführtes, in reifen T-Zellen normalerweise nicht exprimiertes Gen, das zur Expression eines (Poly)peptids fähig ist.
2. T-Zelle nach Anspruch 1, wobei das exprimierte (Poly)peptid auf der Oberfläche exponiert oder sezerniert wird.
3. T-Zelle nach Anspruch 1, wobei das exprimierte (Poly)peptid die Expression endogener Proteine hemmt oder aktiviert, wobei die Hemmung oder Aktivierung zu einer Veränderung des Musters an der Oberfläche exprimierter endogener (Poly)peptide oder sezernierter (Poly)peptide bewirkt.
4. T-Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Rezeptor gegen ein Epitop des Nervensystems gerichtet ist.
5. T-Zelle nach Anspruch 4, wobei das Epitop ein Epitop des zentralen Nervensystems ist.
6. T-Zelle nach Anspruch 4, wobei das Epitop ein Epitop des peripheren Nervensystems ist.
7. T-Zelle nach Anspruch 6, wobei das Epitop ein Epitop des Myelinproteins P2 oder S100 ist.
8. T-Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Epitop ein Epitop eines zustandsspezifischen Proteins, APP, eines gewebespezifischen Proteins, eines Rezeptor-

proteins, eines Cytoskelettproteins oder der Tyrosin-Hydroxylase ist.

9. T-Zelle nach einem der Ansprüche 1, 2 und 4 bis 7, wobei das exprimierte (Poly)peptid ein neutropher Faktor ist.
10. T-Zelle nach Anspruch 8, wobei der neurotrophe Faktor NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5 und NT-6 ist.
11. T-Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 10, die den $CD4^+$ $CD8^-$ -Phänotyp aufweist.
12. T-Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 10, die den $CD4^-$ $CD8^+$ -Phänotyp aufweist.
13. T-Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das extern eingeführte Gen unter der Kontrolle retroviraler Regulationselemente steht.
14. T-Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das extern eingeführte Gen unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht.
15. T-Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das extern eingeführte Gen unter der Kontrolle T-Zell-spezifischer Regulationselemente steht.
16. T-Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das extern eingeführte Gen rekombinanter Bestandteil des Genoms eines lytischen/lysogenen T-Zell-spezifischen Virus ist, welches die T-Zelle nach Anheftung des Rezeptors an das Zielepitop lysieren kann.
17. Arzneimittel, enthaltend eine T-Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 16 in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

18. Verwendung einer T-Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 17 zur Behandlung degenerativer Erkrankungen, Läsionen, Traumata, Infektionen, Autoimmunkrankheiten, Immunsuppressionen, Tumoren, ALS, vaskulärer Insulte, Alzheimer-Krankheit, Parkinson'scher Krankheit, Multipler Sklerose oder akuter Ödeme.

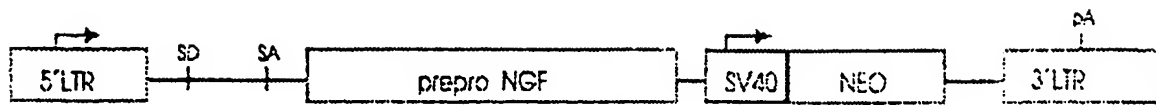
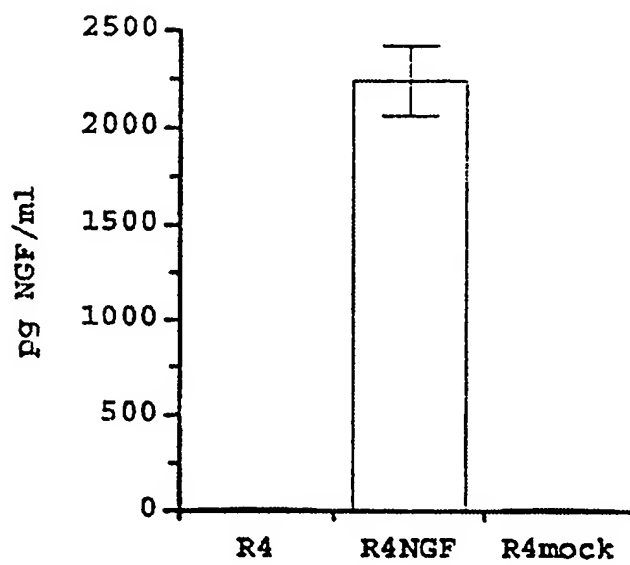
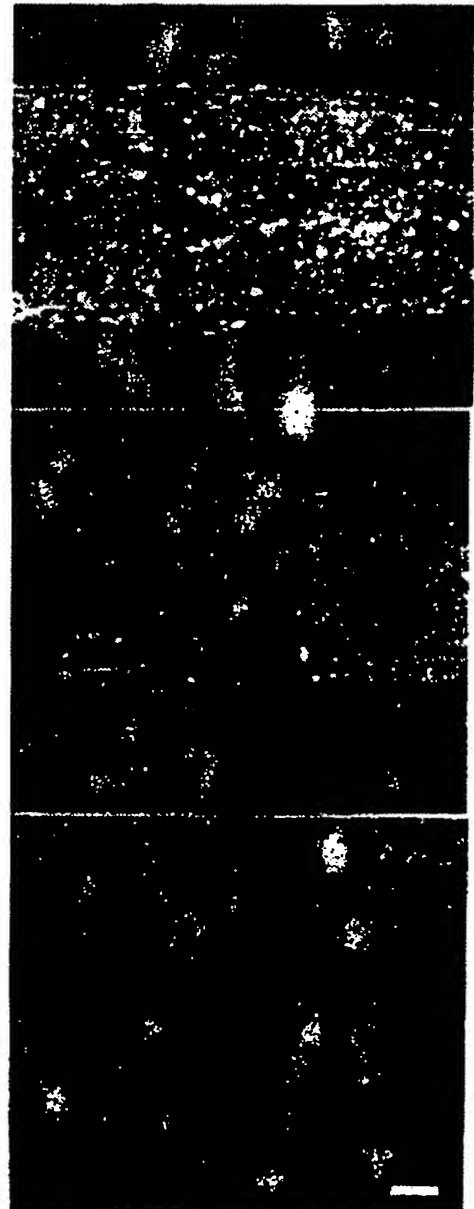
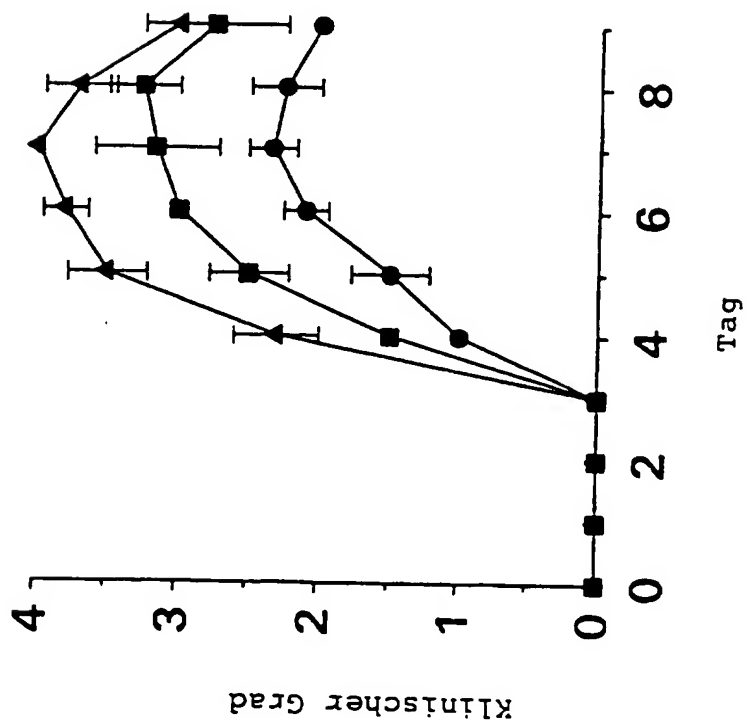
a**b****c**

FIG. 1

a



b

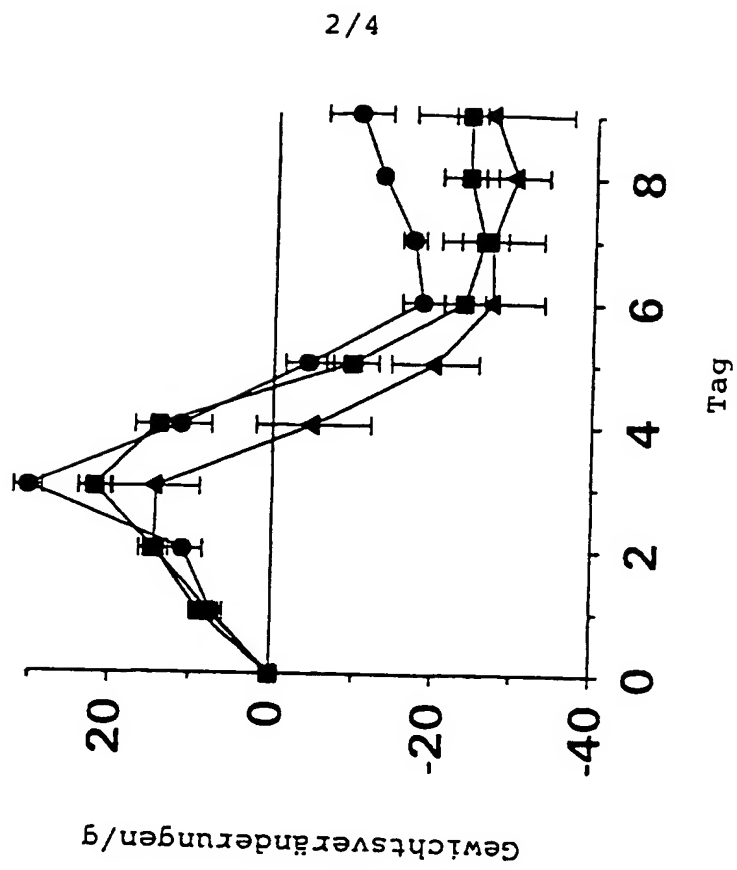
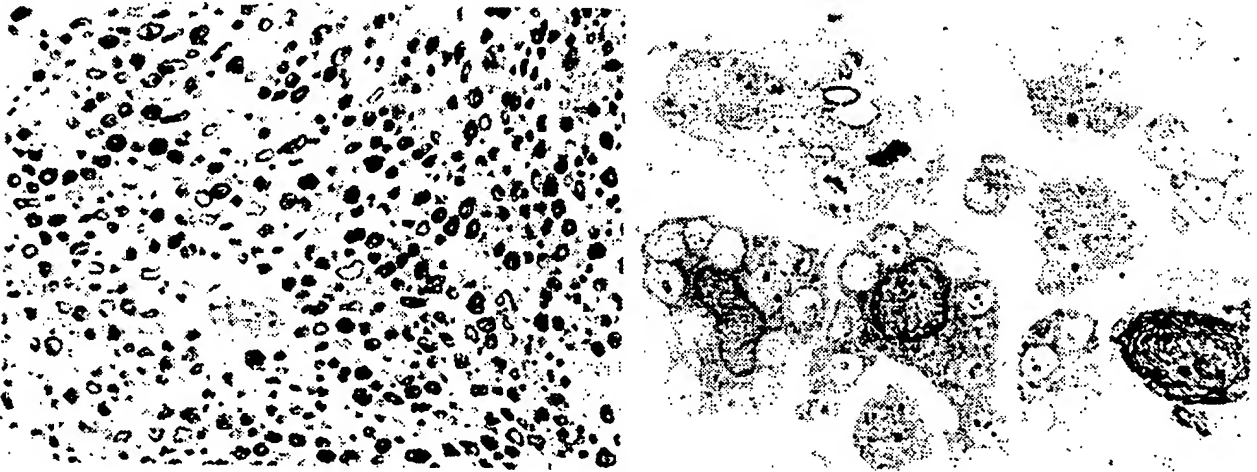


FIG. 2

a



b



c

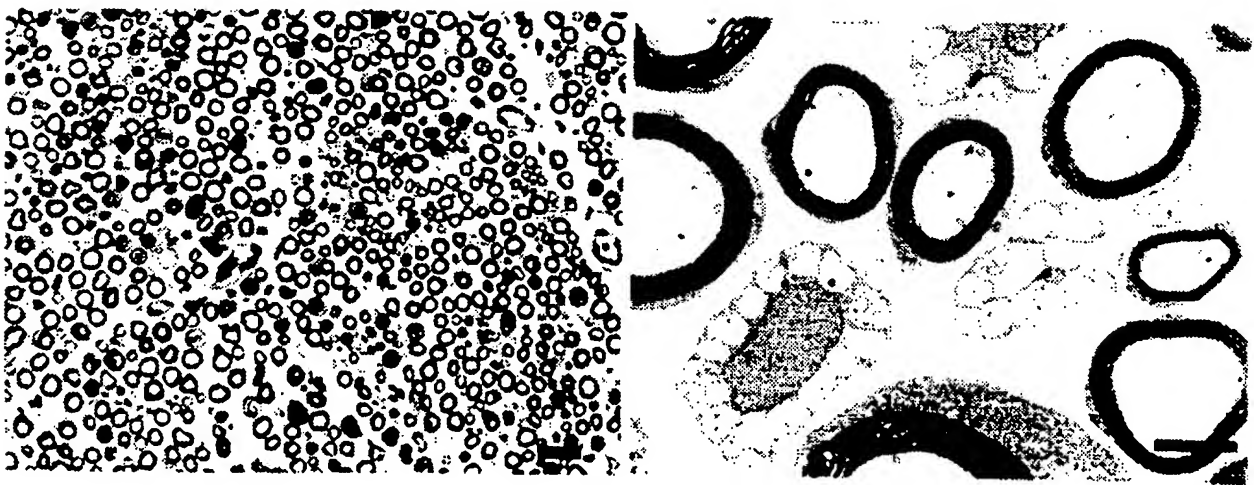


FIG. 3

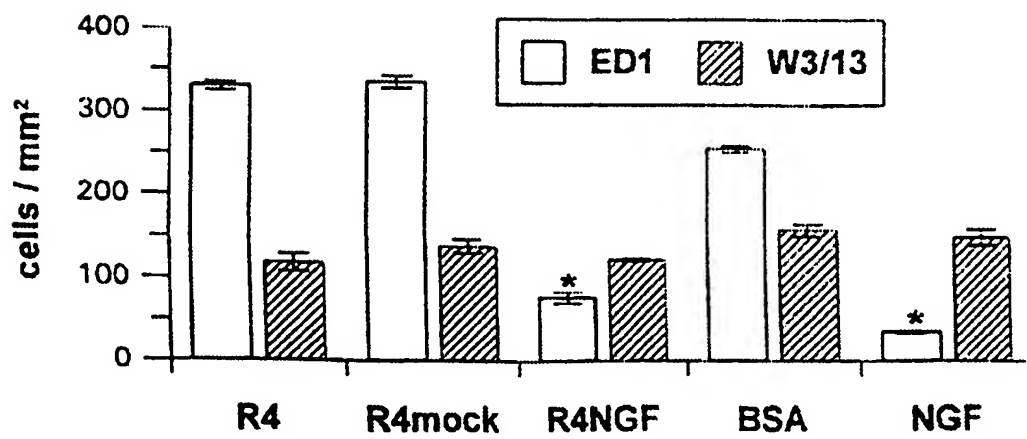
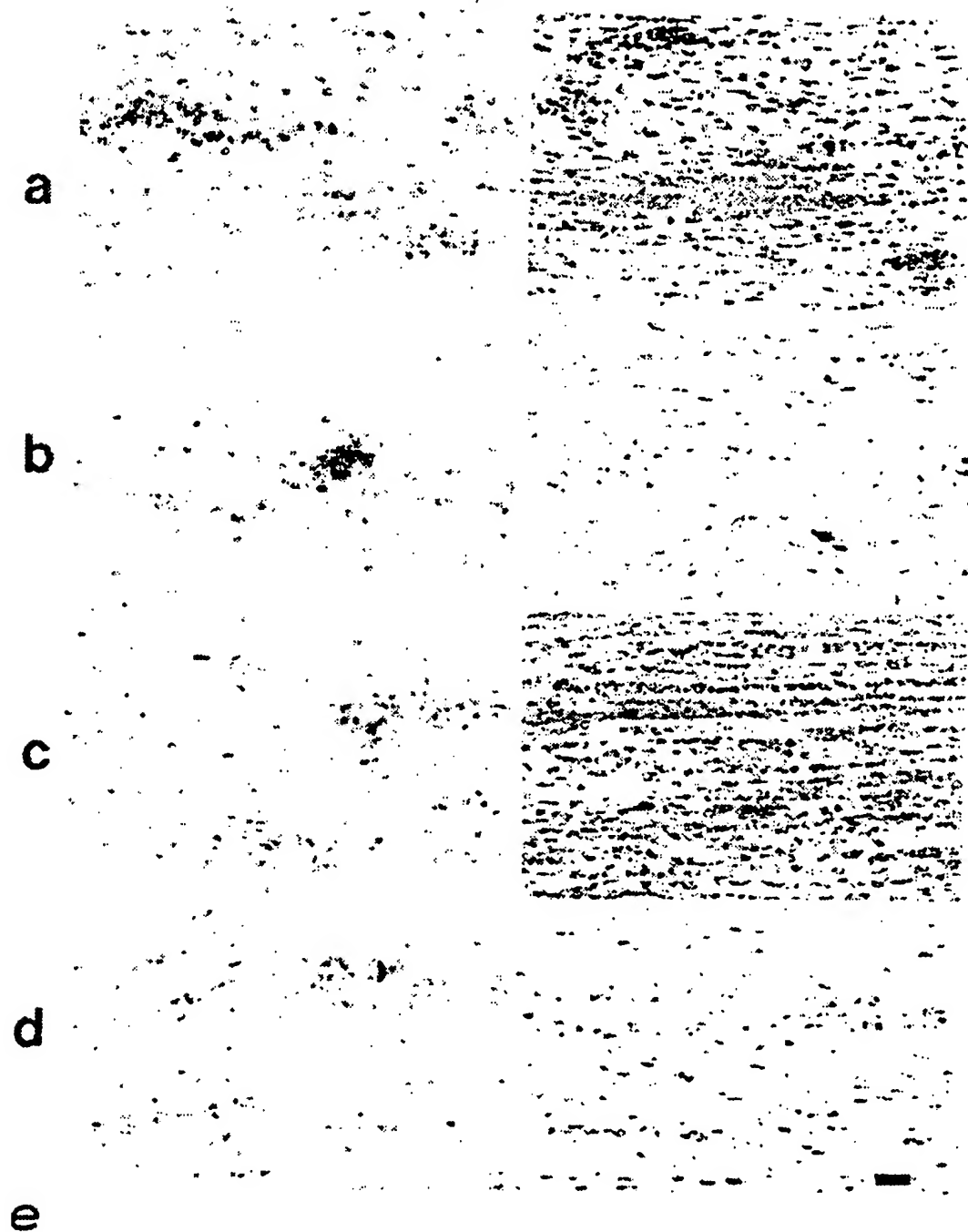


FIG. 4
ERSATZBLATT (REGEL 26)

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/85 C12N5/10 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, SUPPLEMENT 17E, - 1993 page 215 KRAMER ET AL 'SELF-SPECIFIC T LYMPHOCYTE LINES AS VEHICLES FOR GENE THERAPY: MYELIN SPECIFIC T CELLS CARRYING EXOGENOUS NERVE GROWTH FACTOR GENE' see abstract ---	1-15, 17, 18
X	WO, A, 91 05037 (HABERMAN ALLAN B) 18 April 1991 see page 8, line 7 - page 12, line 21 see page 62, line 14 - page 67, line 7 --- -/--	1-3, 8, 11-15, 17, 18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 December 1995

Date of mailing of the international search report

16.01.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO,A,92 05794 (IMMUNEX CORP) 16 April 1992</p> <p>see page 3, line 20 - page 4, line 8 see page 6, line 35 - page 20, line 30 ---</p>	<p>1-3,8, 11-15, 17,18</p>
X	<p>BLOOD, vol. 83, no. 7, 1 April 1994 pages 1988-1997, MAVILIO ET AL 'PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AS TARGET CELLS OF RETROVIRAL VECTOR-MEDIATED GENE TRANSFER' see the whole document -----</p>	<p>1-3,8, 11-15, 17,18</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 95/03410

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although Claim 18 is directed to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9105037	18-04-91	US-A-	5188959	23-02-93
		AU-B-	6541990	28-04-91
		CA-A-	2066208	29-03-91
		EP-A-	0496769	05-08-92
		US-A-	5354686	11-10-94

WO-A-9205794	16-04-92	AU-B-	651397	21-07-94
		AU-B-	8851191	28-04-92
		CA-A-	2092548	29-03-92
		EP-A-	0553186	04-08-93
		JP-T-	6503719	28-04-94
US-A-	5470730	28-11-95		

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 C12N15/85 C12N5/10 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, SUPPLEMENT 17E, - 1993 Seite 215 KRAMER ET AL 'SELF-SPECIFIC T LYMPHOCYTE LINES AS VEHICLES FOR GENE THERAPY: MYELIN SPECIFIC T CELLS CARRYING EXOGENOUS NERVE GROWTH FACTOR GENE' siehe Zusammenfassung ---	1-15, 17, 18
X	WO, A, 91 05037 (HABERMAN ALLAN B) 18. April 1991 siehe Seite 8, Zeile 7 - Seite 12, Zeile 21 siehe Seite 62, Zeile 14 - Seite 67, Zeile 7 --- -/--	1-3, 8, 11-15, 17, 18

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- * 'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- * 'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- * 'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- * 'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- * 'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* 'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* 'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* 'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* '&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Dezember 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16. 01. 96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Sitch, W

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,92 05794 (IMMUNEX CORP) 16.April 1992 siehe Seite 3, Zeile 20 - Seite 4, Zeile 8 siehe Seite 6, Zeile 35 - Seite 20, Zeile 30 ---	1-3,8, 11-15, 17,18
X	BLOOD, Bd. 83, Nr. 7, 1.April 1994 Seiten 1988-1997, MAVILIO ET AL 'PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AS TARGET CELLS OF RETROVIRAL VECTOR-MEDIATED GENE TRANSFER' siehe das ganze Dokument -----	1-3,8, 11-15, 17,18

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 18
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der Anspruch 18 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-9105037	18-04-91	US-A-	5188959	23-02-93
		AU-B-	6541990	28-04-91
		CA-A-	2066208	29-03-91
		EP-A-	0496769	05-08-92
		US-A-	5354686	11-10-94

WO-A-9205794	16-04-92	AU-B-	651397	21-07-94
		AU-B-	8851191	28-04-92
		CA-A-	2092548	29-03-92
		EP-A-	0553186	04-08-93
		JP-T-	6503719	28-04-94
US-A-	5470730	28-11-95		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.